ANNALES
UNIVERSITATIS MARIAE CURIE-SKŁODOWSKA
LUBLIN—POLONIA
VOL. VI, 12 SECTIO D 1951

Z Zakładu Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Lublinie
Kierownik: prof. kontr. doc. dr med. Stanisław Grzycki

Stanisław GRZYCKI

Wpływ temperatury na układ sferoidalny Golgi-Thomasa i ziarenka neurosekrecyjne w komórkach nerwowych zwojów mózgowych ślimaków *(Limnaea stagnalis* L.*)*.

Влияние температуры на сфероидальную систему Гольджи-Томаса и нейросекреционные зерна в нервных клетках мозговых ганглиев улитки *(Limnaea stagnalis* L.*)*.

The influence of temperature upon the Golgi-Thomas spheroidal system and the neurosecretory granules in the ganglion cells of the snails *(Limnaea stagnalis* L.*)*.

Opracowując u ślimaków zagadnienie neurosekrecji komórek zwojowych postanowiliśmy przebadać w nich zachowanie się układu sferoidalnego Golgi—Thomasa i ziarenek neurosekrecyjnych pod wpływem różnych temperatur. Problem ten bowiem, jak można sądzić na podstawie znajomości dostępnej literatury, nie był jeszcze omawiany.

Scharrer, Palay i Nilges (1945), Lennette i Scharrer (1946), oraz Thomas (1948), ograniczyli się w badaniach swoich do obserwacji rytmu pracy komórek zwojowych różnych zwierząt zwracając w pierwszym rzędzie szczególną uwagę na umiejscowienie, strukturę i analizę cytochemiczną ziarenek neurosekrecyjnych. Podobnie Lewynson i Platonowa (1947, 1948), oraz Lewynson i Utyna (1949) stwierdzili, że neurony u pszczół *(Apis mellifica) i* żab *(Bufo viridis, Bombina bombina)* pracują cyklicznie, miarowo, przy czym wydzielina

ich jest wytworem jądra i cytoplazmy, i wiąże się z kwasem DRN, a nie, jak twierdzą badacze szkoły amerykańskiej, z kwasem RN. Polenow natomiast obserwując komórki nerwowe u ryb *(Cyprinus carpio* L.) zwrócił uwagę na zmienność morfologiczną tych komórek i na prawdopodobną łączność czynnościową pomiędzy układem Golgiego i ziarenkami wydzieliny. Zmienność morfologiczną aparatu Golgiego w komórkach nerwowych opisywali również Brambel Rogers i Gatenby Bronte (1924), Rau Subba i Ludford (1925), Covell (1927), Estermann i Gitlitz (1927). Estermann i Gitlitz stwierdzili nawet, że aparat Golgiego pozostawał w ścisłym związku z tworzeniem i różnicowaniem się komórki nerwowej. W komórkach młodych był on jasny i wyraźny, podczas gdy w komórkach starych mało zróżnicowany.

Należałoby jeszcze wspomnieć o badaniach Covella i Scotta (1928), którzy omawiają współzależność pomiędzy ziarenkami i wodniczkami wybarwionymi przyżyciowo czerwienią obojętną a siatką aparatu Golgiego wyczernioną czterotlenkiem osmu.

Mimo jednak licznych badań problem neurosekrecji nie jest jeszcze zamknięty. Wyniki przedstawione przez różnych autorów są różne, a to upoważnia nas do podjęcia nowych prób na drodze doświadczalnej.

Materiał i metodyka badań

Badania cytologiczne przeprowadzone były nad utrwalonymi komórkami nerwowymi zwojów mózgowych *(ganglia cerebralia)* ślimaków *(Limnaea stagnalis* L.) zebranych w podmiejskim stawie w miesiącu sierpniu 1950 roku. Ślimaki umieszczono w trzech szklanych naczyniach pojemności 2 litrów wypełnionych w $^2/_3$ wodą. Zanurzone w wodę termometry rtęciowe przytwierdzone były w ten sposób, by nie dotykały dna i ścianek naczyń. Po dokładnym oznaczeniu temperatury wody, która wynosiła +18°C pobierano materiał z kilku ślimaków, a uzyskane wyniki były dla nas kontrolą porównawczą przeprowadzonych doświadczeń.

Doświadczenia polegały na ostrożnym podgrzewaniu wody w słojach przy pomocy mikropalników gazowych do temperatury +25°, 30°, 35°, 40° i 45°C. Ślimaki pozostawały przez okres 20—30 minut w odpowiedniej temperaturze, po czym pobierano z nich materiał do badań.

Wycinki utrwalano w alkoholu bezwodnym, sublimacie 6%, formolu obojętnym 1:9, w płynach Carnoy, Kralingera, Bouina i Regauda oraz w azotanie uranu według R. y Cajala. Wszystkie płyny utrwalające były zawsze ogrzewane do temperatury w jakiej znajdowały się doświadczalne ślimaki.

Skrawki mikrotomowe grubości 15—30 mikronów, po odparafinowaniu, barwiono hematoksyliną żelazistą, hematoksyliną-eozyną, błękitem toluidyny, według metody Massona, Wallarta i Houette, Mallory'ego, oraz według Feulgena celem wykazania kwasu DRN.

Badania własne

Badania doświadczalne poprzedzone były przeglądnięciem preparatów pochodzących ze ślimaków kontrolnych przebywających przez czas dłuższy w wodzie o temperaturze +18°C. Staraliśmy się ustalić umiejscowienie, strukturę i fazę pracy układu Golgiego, oraz umiejscowienie, wielkość i ilość ziarenek i wodniczek wydzielniczych, spodziewając się, że w ten sposób można będzie wykazać nie tylko morfologiczną, ale także fizjologiczną współzależność jednych elementów od drugich. Skrawki mikrotomowe grubości 15—30 mikronów barwiliśmy hematoksyliną żelazistą według Heidenhaina, hematoksyliną-eozyną, według metody Massona, według metody Cajala dla wykazania aparatu Golgiego, oraz błękitem toluidynowym według Nissla celem wybarwienia ciałek tygroidu.

Drobne ziarenka i większe od nich wodniczki rozrzucone były nieregularnie po cytoplazmie, przeważnie jednak zgrupowywały się one w stożku aksonowym i w strefie przyjądrowej. Ilość i wielkość ziarenek i wodniczek w różnych komórkach była różna. Można jednak było w pojedynczych komórkach prześledzić stopniowy wzrost wielkości i ilości ziarenek, a przede wszystkim wodniczek. W obwodowych częściach komórek wodniczki były zwykle większe od tych, które znajdowały się w strefie przyjądrowej. Największe i najliczniejsze natomiast obserwowaliśmy w stożku aksonowym, przy czym zauważyliśmy także istnienie różnic intensywności barwienia pomiędzy ziarenkami a wodniczkami. Różnice te wystąpiły szczególnie wyraźnie po zabarwieniu według Massona oraz hematoksyliną-eozyną. Wodniczki bowiem barwiły się na kolor zielony albo różowy o wiele słabiej, a nawet nieraz miały wygląd ledwo dostrzegalnych cieni.

Przyjądrowe względnie jednobiegunowe skupienie się ziarenek i wodniczek pozwalało myśleć o możliwości istnienia fizjologicznych połączeń pomiędzy jądrem a ziarenkami, tym bardziej, że w miejscach tych znajduje się również strefa czynnościowa Golgiego. Na tego rodzaju połączenia czynnościowe pomiędzy wydzieliną a jądrem wskazywały prace M a z i a r s k i e g o (1911), K u r k i e w i c z a (1931) i P a w l i k o w s k i e g o (1935, 1937, 1938). Ziarenka i wodniczki więc mogłyby być prawdopodobnie wytworem jądra, nie mniej jednak badania cytochemiczne przeprowadzone przez nas nie wskazywały na to.

Barwienie kwasem fuksyno-siarkowym, to znaczy odczynnikiem Schiffa według Feulgena, preparatów utrwalonych w sublimacie 6% z kwasem octowym lodowatym i w płynach Carnoy i Kralingera, mimo dokładnie przeprowadzonego odczynu jądrowego na kwas DRN, dawało zawsze ujemny wynik dla ziarenek i wodniczek (G r z y c k i, 1951). Użyty natomiast przyżyciowo według Lasfarguesa i Di Fine roztwór barwika trójmetyl tioniny zabarwiał wybiórczo na kolor niebiesko-różowy ziarenka i wodniczki pozostawiając niezabarwione jądro (G r z y c k i, 1951). Uzyskanie takiej cytochemicznej analizy barwnej nie wykluczyło możliwości udziału jądra w procesie wytwórczym, zwróciło jednak uwagę na bliższy, a może nawet i ściślejszy związek jaki istnieje pomiędzy ziarenkami i wodniczkami a układem sferoidalnym Golgiego.

Układ Golgiego w komórkach nerwowych badanych zwojów mózgowych u Limnaea wyczerniliśmy stosując metodę uranowo-srebrową Cajala. Układ ten utworzony był z większych lub mniejszych systemów sferoidalnych pojedynczych albo powiązanych cieniutkimi nićmi ziarnistej budowy. Największe nagromadzenie elementów Golgiego można było obserwować w strefie przyjądrowej, najczęściej jednak na biegunie aksonowym jądra, gdzie też znajdowały się typowe kompleksy sferoidalne Thomasa.

Umiejscowienie i wielkość układu Golgiego były różne w różnych komórkach, nawet tego samego zwoju mózgowego. Także ilość elementów Golgiego w poszczególnych komórkach ulegała znacznym wahaniom, a to zaś było prawdopodobnie uwarunkowane zdolnością produkcyjną przemian neurocytoplazmatycznych. We wszystkich neuronach ilościowo przeważały zwykle drobne ziarenka nad kompleksami

sferoidalnymi, przy czym te ostatnie grupowały się przeważnie w stożku aksonowym.

Przedłużenie czasu impregnacji azotanem uranu i azotanem srebrowym powodowało wyczernianie się całych ciałek sferoidalnych, i wówczas obserwacje nad ilością i ułożeniem Externum, oraz nad wielkością Internum stawały się niemożliwe. Cain (1948) widział podobne ciała u Helix, Planorbis i Limnaea po zabarwieniu preparatów błękitem metylenowym w roztworze 1:10.000, błękitem Nilu i czerwienią obojętną, a przez przedłużenie działania czterotlenku osmu uzyskiwał również wyczernianie się całych ciałek sferoidalnych. Nie wydaje się nam, by całkowite wybarwianie się kompleksów Thomasa nie było uzależnione od kaprysów samej techniki Cajala lub Mann—Kopscha, tym bardziej, że uzyskiwaliśmy preparaty, na których ciałka kompleksowe miały wyznaczony czarny rąbek Externum i niezabarwione Internum.

Umiejscowienie i struktura układu Golgiego w neuronach Limnaea obserwowane na naszych preparatach odpowiadały obrazom przedstawionym przez Cain'a (1948), Thomas'a (1947) i Moussa (1950), z tą tylko różnicą, że wykazane przez nich pałeczkowate utwory otoczone archoplazmą *(battonetes)* uważaliśmy raczej za układy mitochondrialne i nie włączaliśmy ich do właściwego systemu Golgiego. Nie odpowiadały one bowiem swoją strukturą kompleksom sferoidalnym dokładnie zresztą spostrzegalnym w żywych i utrwalonych neuronach, a mimo tego kwestionowanym przez zwolenników teorii batonetów. Przecież Moussa sam stwierdza, że aparat Golgiego utworzony jest z półksiężycowatych, rzadziej pierścieniowatych diktiosomów, że diktiosomy *(sc. batonety)* można wykazać hematoksyliną Regaud—Heidenhaina i czterotlenkiem osmu, oraz że nie barwią się one przyżyciowo czerwienią obojętną i błękitem metylenowym. Moussa także, opisując diktiosomy w neuronach Limnaea uważa otaczającą je archoplazmę za miejsce formowania się produktu Golgiego *(lipochrome globules)*, który zostaje wydalony do cytoplazmy i dopiero wówczas można go wybarwić przyżyciowo czerwienią obojętną i błękitem metylenowym. Ten sposób interpretowania obserwowanych obrazów jest, jak wydaje nam się, ratowaniem utraconych pozycji przez zwolenników teorii batonetów .Zresztą dokładne histochemiczne badania Cain'a są należytą odpowiedzią dla tych badaczy. We wszystkich komórkach bowiem, w których znajdują się elementy sferoidalne, istnieją

oczywiście i chondriosomy o charakterze specjalnym *(batonety)* mniej lub więcej wyraźnie zaznaczonym, zależnym zresztą od samych komórek i ich możliwości produkcyjnych. Główną jednak rolę w procesach sekrecyjnych odgrywa układ Golgiego, który łącznie z chondriomem przedstawia związek sympleksowy czynnościowy, dynamiczny, ważny dla syntezy i produkcji, a nie związek morfologiczny wyrażony tylko stosunkiem fizyko-chemicznym, czy choćby nawet tylko fizjologicznym.

W neuronach Limnaea jest bardzo mało batonetów w cytoplazmie, a użyta przez nas metoda wykazywała ciałka sferoidalne, co do których nie mieliśmy żadnych wątpliwości, tym bardziej że znajdowały się one w strefach czynnościowych Golgiego. Już samo więc umiejscowienie elementów Golgiego i materiału neurosekrecyjnego pozwalało myśleć o możliwościach istnienia nie tylko morfologicznego, ale także i fizjologicznego związku pomiędzy jednymi a drugimi. Na ten związek zwróciliśmy uwagę omawiając umiejscowienie, strukturę i budowę ziarenek i wodniczek neurosekrecyjnych w komórkach nerwowych zwojów mózgowych u Limnaea, Planorbis i Paludina. Wówczas dokładne porównanie wodniczek wydzielniczych z produktem Golgiego pozwoliło stwierdzić, że pomiędzy jednymi i drugimi nie ma zasadniczych różnic morfologicznych, i że wodniczki są najprawdopodobniej końcową fazą czynności systemu Golgiego. Ziarenka neurosekrecyjne natomiast wydają się być materiałem, z którego pod wpływem nieznanych jeszcze przemian powstają golgiosoma, kompleksy sferoidalne i w końcu wydzielina dojrzała *(produkt)*. Umiejscowienie zaś ziarenek neurosekrecyjnych w bezpośredniej bliskości jądra komórki, może wskazywać albo na pochodzenie, albo na łączność z jądrem, na co jednak w tej chwili dowodów cytochemicznych brak. Badania Lewynsona, Platonowej, Utyny, Polenowa, Scharrera E., Scharrera B., Pallay, Lennette, a nawet Casperssona, Pollistera, Bracheta, i innych mogą w tym wypadku rzucić pewne światło na to zagadnienie.

I. grupa doświadczalna

Ślimaki pozostawały przez 30 minut w wodzie o temperaturze +25°C. Wycinki utrwalono w formolu obojętnym 1 : 9, w płynie Regauda i w azotanie uranu według Cajala. Skrawki mikrotomowe po odparafinowaniu barwiono hematoksyliną Heidenhaina wg Massona, hematoksyliną żelazistą i hematoksyliną-eozyną. Szczególnie metody

Heidenhaina i Massona w modyfikacjach Wallarta i Houette były bardzo pomocne w określeniu rozmieszczenia, ilości i wielkości substancji neurosekrecyjnej.

Przeglądając seryjne preparaty mogliśmy się przekonać, że umiejscowieniem i ilością ziarenek i wodniczek wydzielniczych nie wiele różniły się one od skrawków kontrolnych (+18°C). Strefa przyjądrowa i to przeważnie na biegunie aksonowym jądra obfitowała, jak zwykle, w pojedyncze, drobne ziarenka barwiące się wybiórczo, pomiędzy którymi znajdowało się kilka lub kilkanaście wodniczek różnej wielkości. Próbowaliśmy nawet zliczyć ilość ziarenek i wodniczek w komórkach, zawsze jednak pierwsze ilościowo przeważały nad drugimi, a wahania uzyskanych liczb były tak duże i tak zmienne, że o dopatrywaniu się jakiegoś stałego stosunku pomiędzy nimi mówić nie można. Zbieranie się natomiast materiału neurosekrecyjnego w polu strefy czynnościowej pozostaje prawdopodobnie w związku ze szczególnymi własnościami tej okolicy, która jest, jak to niejednokrotnie podkreślaliśmy, miejscem ożywionej syntezy i przeróbki. Obraz ten więc przypominał wyniki, które otrzymaliśmy barwiąc żywe, izolowane neurony trójmetylem tioniny, a że był on niemal w każdej komórce inny, mógł być zatem prawdopodobnie oceną wartości wydzielniczej, względnie wskaźnikiem dynamizmu przemian odbywających się w neurocytoplazmie. Miernikiem wartości wydzielniczej, jakoteż wskaźnika przemian były dla nas zawsze ilość i wielkość wodniczek, oraz wielkość powierzchni strefy czynnościowej Golgiego. I jeśli przyjęło się, że ta ostatnia jest dokładnym wykresem procesu wydzielniczego, można było na podstawie obserwacji porównawczych określić stopień i fazę rytmu pracy komórki.

W wyczernionym uranowo-srebrową metodą systemie Golgiego różnic wyraźniejszych w porównaniu z preparatami kontrolnymi również nie znaleźliśmy. Umiejscowienie i wielkość aparatu Golgiego odpowiadała strefie czynnościowej wyznaczonej obecnością ziarenek i wodniczek neurosekrecyjnych. Podobieństwo natomiast kompleksów sferoidalnych do wodniczek, oraz gromadzenie się ziarenek w polu Golgiego zwracało uwagę na możliwość istnienia łączności czynnościowej pomiędzy jednymi a drugimi, na co zresztą wskazywały badania Polenowa, Lewynsona, Platonowej, Bourne'a (1945) i Brambella (1923), który nawet podaje, że w neuronach aparat Golgiego jest odpowiedzialny za proces wydzielniczy.

II. grupa doświadczalna

Ślimaki pozostawały przez 20—30 minut w wodzie o temperaturze +30°C. Materiał pobrany do badań utrwalano w alkoholu bezwodnym, alkoholu-formolu, formalinie obojętnej 1 : 9, w płynach Bouina, Regauda i w azotanie uranu według Cajala. Skrawki mikrotomowe grubości 15 mikronów barwiono hematoksyliną żelazistą, trójkolorowym zestawieniem barwików według Massona, oraz według metody Massona w modyfikacji Wallarta i Houette z zielenią jasną albo z błękitem aniliny. Jak można było po zabarwieniu zauważyć, wodniczki były jaśniejsze od fuksynochłonnych ziarenek, a nawet zwykle w odróżnieniu od nich barwiły się chętniej zielenią względnie błękitem aniliny. Tę właściwość wodniczek omawialiśmy już w poprzednich naszych pracach, a Thomas (1947) badając cytologię neuronów u *Helix aspersa* oprócz zmienności barwienia się wodniczek zwrócił także uwagę na bardzo charakterystyczną jasną wąską obwódkę podobną raczej do barwikoopornej przestrzeni, która znajdowała się dokoła nich. Przestrzeń ta powstała najprawdopodobniej jeszcze przed zamknięciem preparatów w parafinie na skutek rozpuszczenia lipoidowej otoczki Externum w alkoholach albo ksylenie. Obserwacja Thomasa dotyczy więc kompleksów sferoidalnych, a nie wodniczek neurosekrecyjnych opisywanych przez Scharrera E., Scharrera B., Lewynsona, Polenowa, Gutnera i innych. Podkreśla ona również morfologiczne podobieństwo jakie istnieje pomiędzy wodniczką wydzieliny a ciałkiem sferoidalnym, co nieraz uniemożliwia przeprowadzenie ścisłego zróżnicowania.

Ziarenka i wodniczki rozsypane były po całej cytoplazmie, przy czym w stożku aksonowym i dokoła jądra było ich najwięcej. Odnosiło się nawet wrażenie, że ilość ziarenek i wodniczek uległa zwiększeniu we wszystkich neuronach. Mimo tego wodniczek było niewiele i przeważnie umiejscowione one były w częściach obwodowych komórki.

Ciekawe były wyniki uzyskane po porównaniu umiejscowienia elementów neurosekrecyjnych z umiejscowieniem elementów Golgiego, oraz odczytanie współzależności morfologicznej pomiędzy jednymi a drugimi. Otóż okazało się, że elementy Golgiego, a przede wszystkim golgiosoma rozsypane były po całej neuroplazmie, stałego jednak umiejscowienia ich w strefie przyjądrowej względnie w stożku aksonowym nie można było dopatrywać się. Nie można było także zauważyć kształtowania się siatkowatych struktur typowych dla aparatu Golgiego

i rysowanych przez Golgiego, Weigla i innych morfologów. Elementy Golgiego zatem zajmowały w topografii komórki raczej miejsce pośrednie pomiędzy ziarenkami a wodniczkami neurowydzielniczymi.

Ziarenka Golgiego wyczerniały się azotanem uranu mniej więcej wszystkie jednakowo, wielkością jednak różniły się pomiędzy sobą. Ziarenka największe mimo całkowitego wysrebrzenia zaliczaliśmy już do kompleksów sferoidalnych, w których otoczka zewnętrzna prawdopodobnie była gruba, a wodniczka wewnętrzna albo znajdowała się w okresie formowania się, albo była jeszcze zbyt małą, by można ją było łatwo wykazać. Najtypowiej ukształtowane ciałka sferoidalne znajdowaliśmy prawie zawsze i wyłącznie w stożku aksonowym, a że obraz ten powtarzał się zbyt często w obserwowanych przez nas neuronach zwojów mózgowych u ślimaków, nie można go uznać za przypadkowy.

Ilość elementów Golgiego, jak wydawało nam się, nie wzrosła, uległy one tylko rozproszeniu po całej cytoplazmie, a że podobne obrazy spostrzegaliśmy nawet w neuronach kontrolnych, nie możemy uważać ich za typowe dla badanego okresu doświadczenia. Być może jednak, że stopień rozproszenia układu Golgiego i materiału neurosekrecyjnego po cytoplazmie komórek jest dowodem zwiększenia się strefy czynnościowej, a tym samym świadczy o wzmożonym dynamizmie przemian neuroplazmatycznych. Także gromadzenie się ciałek kompleksowych Thomasa w stożku aksonowym obok wodniczek, oraz umiejscowienie wodniczek również i na obwodzie komórki, pozwala myśleć o wzmożonym procesie wydzielniczym, tym bardziej, że ilość barwiących się ziarenek fuksynochłonnych i wodniczek była większa w porównaniu ze stanem w komórkach kontrolnych. Obserwując wodniczki należało pilnie przeprowadzić zróżnicowanie z ciałkami kompleksowymi sferoidalnymi Thomasa, te bowiem stanowią właściwą jednostkę czynnościową. Z ciałkami sferoidalnymi należy także zidentyfikować ziarenka lipochromów opisane przez L e g e n d r e (1909) w komórkach nerwowych u Helix, oraz ziarenka lecytyny obserwowane przez G a t e n b y (1923) oraz przez G a t e n b y i H i l l a (1934). I jedne i drugie barwią się bowiem przyżyciowo błękitem metylenowym (Y o u n g, 1932) albo czerwienią obojętną (T h o m a s, 1947), a czterotlenkiem osmu można wyczernić dokoła nich cienką osłonkę Externum. W ten sposób staje się znowu aktualna dyskusja na temat struktury i budowy chemicznej „vacuome“ P a r a t a, oraz błonki granicznej W o r l e y'a (1943—

1946), Hirsch'a (1939) i Bakera (1944, 1946, 1947). Prawdopodobnie jednak vacuome Parata, ciałka sferoidalne Thomasa i ziarenka neurosekrecyjne Scharrera & Co, można uznać za elementy układu Golgiego, które tworzą jeśli nie tę samą fazę, to przynajmniej stoją bardzo blisko siebie, przypuszczalnie na pograniczu kompleksu i właściwego produktu.

III. grupa doświadczalna

Podniesienie temperatury wody do +35°C wpłynęło na zwiększenie ruchliwości ślimaków, a także na zwiększenie ich pobudliwości. Zwierzęta pozostawały w wodzie przez 20 minut, po czym pobierano z nich materiał do badań utrwalając go w alkoholu-formalinie, formalinie obojętnej 1 : 9, w płynach Bouina i Regauda, oraz w azotanie uranu. Skrawki mikrotomowe barwiono według metod Regaud—Heidenhaina, Massona, Wallarta i Houette oraz hematoksyliną-eozyną. Część preparatów barwiono także według metody Mallory'ego. Gutner i Nosowa (1951) bowiem używając tej metody mogli wykazać w komórkach ośrodkowego układu nerwowego u człowieka na tle niebiesko zabarwionej protoplazmy czerwone ziarenka wyraźnie odcinające się od otoczenia. Przez zadziałanie na skrawki 0,5% roztworem nadmanganianu potasu, i następnie 1% roztworem kwasu szczawiowego, jeszcze przed barwieniem Mallory'ego, uzyskiwali autorzy wielką kontrastowość barwienia się ziarenek.

Obrazy cytologiczne obserwowane przez nas w neuronach po podwyższeniu temperatury do +35°C nie wiele różniły się od poprzednio opisanych. Różnice ilościowe ziarenek i wodniczek w jednych i drugich preparatach były trudne do uchwycenia, zauważało się natomiast w tym okresie doświadczenia wielkie wahania ilości elementów neurosekrecyjnych nie tylko w różnych komórkach różnych ślimaków, ale także w różnych komórkach przynależnych do jednego zwoju mózgowego. W każdym razie ilość barwiących się elementów była większa w porównaniu z preparatami kontrolnymi.

Ułożenie neurowydzielniczych ziarenek i wodniczek w cytoplazmie przypominało rysunki Gutnera i Nosowej sporządzone z komórek występujących w miejscu sinym *(locus coeruleus)* mostu Varola. Wypełniały więc one raczej odcinek aksonowy komórki, nie brak ich było także w innych częściach cytoplazmy, przy czym zauważało się, że posiadają one słabo zaznaczoną zdolność do skupiania się w większe

lub mniejsze, bardziej zbite lub luźne zespoły ziarniste. Zespoły ziarniste w cytoplazmie cechowały się nie tylko zmiennością ilości elementów tworzących je, ale także zmiennością wielkości i oddziaływania na barwiki. W każdym bowiem zespole znajdowały się ziarenka duże podobne do wodniczek i wodniczki, które słabiej barwiły się od ziarenek małych lub średniej wielkości. Ta zmienność barwienia się wystąpiła bardzo wyraźnie po hematoksylinie żelazistej, a przede wszystkim po zabarwieniu preparatów według Mallory'ego. Wodniczki były zwykle blado różowe, ziarenka duże miały kolor różowy lub ciemno różowy, a małe ziarenka zawsze zabarwiały się na czerwono.

Zauważyliśmy również, że zespoły ziarenek występujące w strefie przyjądrowej były uboższe w ziarenka duże, a przede wszystkim w wodniczki. Ten stan powtarzał się nie we wszystkich komórkach, nie mniej jednak widoczne były prawie zawsze różnice morfologiczne i cytochemiczne pomiędzy zespołami ziarenek obwodowych a przyjądrowych. Ten stan możnaby także wytłumaczyć przebiegiem procesu dojrzewania ziarenek, który postępuje od jądra w kierunku obwodu komórki włączając tym samym jądro komórki w początkowe fazy produkcji substancji neurowydzielniczych, a równocześnie wskazując na obwód komórki, jako na powierzchnię wydzielniczą.

Potwierdzeniem zwiększonej pracy komórki nerwowej w naszym doświadczeniu było wykazanie zwiększonej ilości elementów Golgiego, począwszy od czerniących się azotanem uranu i srebra ciałek Golgiego, poprzez kształtujący się system Golgiego, a skończywszy na kompleksach sferoidalnych Thomasa i wodniczkach wydzieliny. Cały więc układ Golgiego rozproszony był po neuroplazmie, przy czym liczebnie wszystkie elementy przeważały raczej w częściach obwodowych komórki ze szczególnym uwzględnieniem stożka aksonowego, który być może w przyszłości okaże się biegunem wydzielniczym neuronu. Kompleksy sferoidalne utworzone z wodniczki wewnętrznej i cieniutkiej otoczki zewnętrznej w niejednych neuronach występowały bardzo blisko siebie, tak że mieliśmy pewne trudności w określeniu, czy każdy kompleks jest w dalszym ciągu samodzielny, względnie czy otoczki zewnętrzne łącząc się pomiędzy sobą dają obraz siatki międzywodniczkowej, a tym samym stanowią wyłącznie resztę Golgiego. Zespoły kompleksów Thomasa obserwowaliśmy w stożku aksonowym i były one połączeniem trzech, czterech a najwyżej pięciu ciałek sferoidalnych, prawie jednakowej wielkości i jednakowo barwiących się według Cajala. Obok zespołów

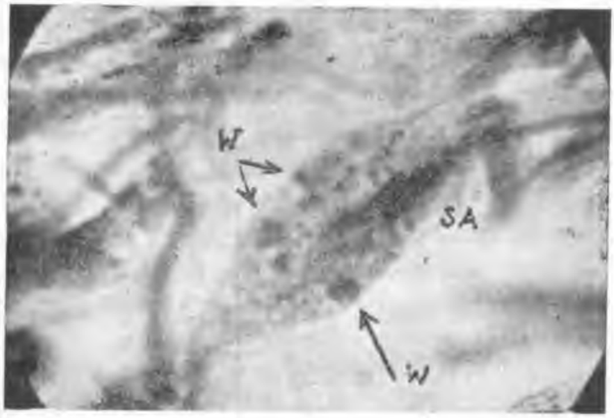
spotykało się także duże i małe ciałka Golgiego, można więc było myśleć, że są one złączone z zespołami nie tylko morfologicznie, ale i czynnościowo.

Zespoły Golgiego i zespoły elementów neurosekrecyjnych umiejscowieniem nie odpowiadały sobie. Zespoły Golgiego zajmowały raczej stanowisko pośrednie pomiędzy strefą przyjądrową i strefą obwodową komórki. W tych strefach przede wszystkim gromadziły się ziarenka i wodniczki. Z pewnym odchyleniem spotykaliśmy się w obrębie bieguna aksonowego, tu bowiem widziało się elementy układu Golgiego—Thomasa obok elementów wydzielniczych. Być więc może, że w ten sposób jest uwidoczniony nie tylko morfologiczny, ale także i fizjologiczny związek pomiędzy ziarenkami i wodniczkami, a elementami Golgiego, oraz, że tak jedne, jak i drugie będąc wyrazem przemian odbywających się w cytoplazmie i jądrze, mogą przechodzić jedne w drugie, przy czym i jedne i drugie stanowią nierozłączalne fazy rytmu pracy komórki.

IV. grupa doświadczalna

W czwartej grupie doświadczalnej umieściliśmy ślimaki, które pozostawały przez 20 minut w wodzie o temperaturze +40°C. Utrwalanie i barwienie skrawków mikrotomowych podobne do poprzednich. Elementy układu Golgiego wykazywaliśmy uranowo-srebrową metodą Cajala, a że roztwór 0,5% azotanu uranu przed wrzuceniem do niego skrawków był ogrzany od temperatury +40°C, skrócono czas utrwalania do 5 godzin. Także zamiast formaliny obojętnej 10% używano 5%. Wyniki utrwalania i barwienia zadowalające.

Ziarenka i wodniczki w neuroplazmie komórek zwojowych, chociaż znajdowały się w stożku aksonowym, to jednak po największej części można je było obserwować w strefach obwodowych, przybrzeżnych komórki. Wodniczki przybrzeżne były zwykle większe, słabo barwiły się, mimo tego wyraźnie odcinały się od otaczającej cytoplazmy. Zauważało się również bardzo wielką rozpiętość rozmiarów wodniczek, najmniejsze z nich bowiem wielkością odpowiadały dużym ziarenkom, a największe dorównywały 1/3 wielkości jądra komórki. I jedne i drugie przeważnie występowały pojedynczo, nie rzadko jednak można było obserwować skupienie się mniejszych 2—3 wodniczek w grupy, przy czym granice pomiędzy wodniczkami były wyraźnie widoczne. (Mikrofot Nr 1).



Mikrofotografia 1

Nie rozstrzygnięty pozostaje dla nas problem: czy wodniczki olbrzymie powstały przez wzrost małych, czy przez połączenie się kilku małych. Wydaje się nam raczej, że tę drugą możliwość należałoby wziąć pod uwagę, tym bardziej, że w wodniczkach dużych można było nieraz zobaczyć jedną albo dwie i więcej bruzd, zaznaczających się mniej lub więcej wyraźnie na ich powierzchni zewnętrznej.

Odczyn barwny po zabarwieniu hematoksyliną żelazistą Heidenhaina, według metody Mallory'ego, trójbarwnej metody Massona, modyfikacja Wallarta i Houette, a nawet po zabarwieniu hematoksyliną-eozyną, był bardzo różnorodny. Ziarenka były przeważnie silnie wysycone barwikiem, podczas gdy w wodniczkach obserwowaliśmy duże różnice w zabarwieniu. Olbrzymie wodniczki bowiem barwiły się najsłabiej i raczej miały wygląd pustych pęcherzyków, albo pęcherzyków wypełnionych substancją oporną na działanie barwików. Hematoksylina żelazista barwiła je jednak na kolor jasno brunatny i nigdy nie wyczerniała całkowicie. Hematoksylina-eozyna zaś niektóre tylko lekko podbarwiała różowo, podobnie jak fuksyna kwaśna, zieleń jasna albo błękit aniliny w trójkolorowych metodach Massona, na odpowiednie kolory czerwony, zielony lub blado niebiesko-różowy, nawet przy bardzo ostrożnym i umiejętnym różnicowaniu kwasem pikrynowym, kwasem fosforomolibdenowym względnie kwasem octowym.

Na obwodzie komórki spotykaliśmy również obok dużych wodniczek także wodniczki średniej wielkości, te zaś barwiły się bardziej

intensywnie, a hematoksylina żelazista przy optymalnym zróżnicowaniu 1,5% ałunem żelazowym prawie zawsze czerniła je. podobnie jak ziarenka strefy przyjądrowej. Należy jednak nadmienić, że i w strefie przyjądrowej istniały różnice w zabarwieniu pomiędzy ziarenkami łatwe do spostrzegania nawet dla oka mniej wprawnego. W każdym razie taka czy inna różnorodność odczynów barwnych wodniczek i ziarenek zjawiająca się we wszystkich neuronach tego samego lub innego zwoju mózgowego, może być, jak wydaje się nam, uważana za dowód istnienia zmienności przemian chemicznych odbywających się w elementach neurowydzielniczych, a towarzyszących procesowi produkcji i wydzielania. Drobne ziarenka barwnikochłonne mogą być prawdopodobnie pierwotnymi ziarenkami wydzielniczymi wyprodukowanymi przez jądro. Wodniczki natomiast, jako zbiorniki wydzieliny dojrzałej albo wydzieliny dojrzewającej posiadają mniejsze, a przy tym zmienne powinowactwo do barwników, co jest uzależnione od ich struktury chemicznej, która ulega przemianom w obrębie strefy czynnościowej układu Golgiego.

Strefa czynnościowa na oglądanych preparatach przesunęła się ku obwodowi komórki, największe jednak jej nasilenie znajdowało się, jak zwykle w obrębie stożka aksonowego. Ilość ciałek Golgiego (golgiosoma) uległa zmniejszeniu, pojawiło się natomiast dużo kompleksów sferoidalnych rozrzuconych po obwodzie cytoplazmy. Zespołowe ułożenie ciałek kompleksowych nie należało do rzadkości, przy czym tylko niektóre z nich posiadały dobrze wykształconą otoczkę zewnętrzną, zwykle bowiem miała ona wygląd krótszego lub dłuższego segmentu przylegającego do Internum. Internum więc może istnieć niezależnie od otoczki, i ona powinna być rozpatrywana raczej jako odmienna morfologiczna struktura. Z tego też punktu widzenia zapatrywania W o r l e y'a o istnieniu w wodniczkach barwnikochłonnej obwodowej strefy, albo wyniki badań B a k e r'a nad budową sudanochłonnej lipoidowej otoczki, względnie wprowadzone przez H i r s c h l e r a i H i r s c h'a pojęcie otoczki zewnętrznej *(externum)* powinny być zawsze brane pod uwagę i dyskutowane, choćby ze względu na ich morfologiczny metabolizm i współzależność fizjologiczną. U Limnaea zagadnienie to nie łatwe jest do rozwiązania. a próby czynione przez T h o m a s'a nie wniosły zasadniczo niczego nowego mimo, że pracował on nad cytologią neuronów *Helix aspersa* i używał specjalnych metod barwnych. Otoczka zewnętrzna ciałek sferoidalnych w neuronach

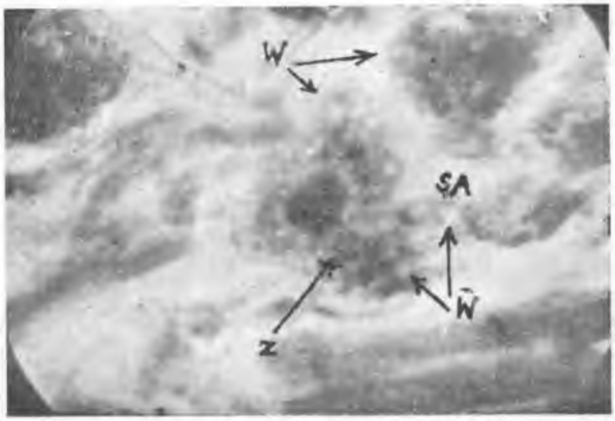
kontrolnych na naszych preparatach była gruba i prawdopodobnie obejmowała dokoła wodniczkę, na co zresztą wskazywał sposób impregnacji azotanem uranu i srebra. Inny wygląd miały ciałka sferoidalne po podwyższeniu temperatury, cechowały się bowiem zmianami umiejscowienia, wzrostu i struktury. Obrazy te więc przypominały zachowanie się elementów Golgiego w komórkach gruczołowych pod wpływem pilokarpiny.

V. grupa doświadczalna

Po podwyższeniu temperatury wody do +45°C tylko niektóre ślimaki zachowały pełną żywotność, inne zaraz w pierwszych minutach skurczyły się i zdechły. Materiał do badań pobierano wyłącznie ze ślimaków żywych, które przez 20 minut przebywały w wodzie o podwyższonej temperaturze. Utrwalanie i barwienie skrawków mikrotomowych podobne do poprzednich. Płyny utrwalające miały temperaturę +40 — +45°C. Wyniki utrwalania i barwienia zadowalające.

Na preparatach widziało się w cytoplazmie neuronów zwiększenie ilości wodniczek i to przede wszystkim w strefie obwodowej (mikrofot. Nr 2). Ziarenek barwnikochłonnych natomiast było bardzo mało, a nawet zauważyliśmy zupełny ich brak w niejednych komórkach. Brak ziarenek w strefie przyjądrowej, albo mała ich ilość może być spowodowana zmniejszeniem względnie osłabieniem siły produkcyjnej komórki. Dowodem tego są obserwowane przez nas zmiany w układzie i ilości chromocentrów kwasu DRN w jądrze komórek zwojowych, które można było wykazać po przeprowadzeniu odczynu Schiffa—Feulgena (Grzycki, 1951). Problem więc udziału jądra w procesie wydzielniczym staje się nieco jaśniejszy, a udział kwasu dezoksyrybonukleinowego (DRN) i kwasu rybonukleinowego (RN) w produkcji ziarenek neurowydzieliny — niewątpliwy. Także Chłopin, Kedrowsky i Dustin (1947) omawiając udział kwasów nukleinowych w procesach wydzielniczych komórek gruczołowych doszli do przekonania, że dominującą rolę odgrywają cytoplazmatyczne rybonukleoproteidy. Hipoteza więc Casperssona i Bracheta znajduje w ten sposób pełne potwierdzenie.

Po zastosowaniu uranowo-srebrowej metody Cajala można było również przekonać się, że cytoplazmatyczna strefa dynamiczna przesunęła się ku obwodowi komórki i że przyspieszona nadprodukcja ciał sferoidalnych i wodniczek wyprzedziła możliwości wytwarzania barw-



Mikrofotografia 2.

nikochłonnych ziarenek i podstawowych elementów Golgiego. Na preparatach bowiem tylko w strefie obwodowej komórki widziało się tu i ówdzie większe lub mniejsze ciałka sferoidalne czerniące się całkowicie lub prawie całkowicie, i kompleksy sferoidalne, w których otoczka zewnętrzna była niejednokrotnie bardzo cienka, podobna do błonki, albo ograniczona do 1--5 guzkowatych zgrubień. Ziarenek Golgiego było mało w porównaniu z ilością ciałek sferoidalnych, przy czym ziarenka przeważnie umiejscawiały się w stożku aksonowym i w najbliższej jego okolicy. Wyglądem swoim przypominały raczej fazę spoczynkową, różnic bowiem w wielkości i barwliwości pomiędzy nimi nie zaobserwowaliśmy. Pojedyncze ciałka sferoidalne i ziarenka Golgiego nie odpowiadały ilością liczbie znajdowanej w komórkach zwojowych kontrolnych, a to może być wyrazem zahamowania rytmu pracy nie tylko układu Golgiego, ale przede wszystkim jądra i cytoplazmy.

Omówienie wyników badań

Oprócz badań morfologicznych mających na celu określenie umiejscowienia, struktury i o ile tylko możliwe budowy chemicznej ziarenek i wodniczek neurowydzielniczych znajdujących się w cytoplazmie niektórych komórek nerwowych ((B r a m b e l, I t o, N a g a h i r o, R o u s s y, M o s i n g e r, G a u p p, H e r z o g, D a w s o n, B o u r n e, S c h a r r e r E., S c h a r r e r B., P a l a y, L e n-

nette, Nilges, Thomas, Lewynson, Platonowa, Polenow, Grzycki, Covell oraz Scott i inni), pojawiają się prace dotyczące powstawania elementów neurosekrecyjnych i następnie ich stosunku do jądra, układu Golgiego i ciałek zasadochłonnych Nissla (Scharrer i Co, Lewynson, Platonowa, Utyna, Polenow, Gutner, Nosowa, Grzycki, Covell i Scott oraz inni).

Brambell, Scharrer i Co oraz Nilges są zdania, że wytwarzanie neurowydzieliny łączy się ściśle z ciałkami Nissla. Istnieje bowiem według tych autorów związek topograficzny, ilościowy i cytochemiczny pomiędzy wodniczkami a ciałkami zasadochłonnymi. Nasze obserwacje przeprowadzone w tym kierunku nie pozwoliły jednak stwierdzić zbyt dużej współzależności pomiędzy jednymi a drugimi. Thomas, Covell, Scott i Polenow natomiast obserwując nagromadzenie się acidofilnych ziarenek w okolicy aparatu Golgiego dopatrują się istnienia nie tylko morfologicznej, ale także i fizjologicznej zależności pomiędzy aparatem a ziarenkami. Brambell nawet wyraźnie stwierdza, że aparat Golgiego w neuronach jest odpowiedzialny za proces wydzielniczy ziarenek Nissla. Znalazł on bowiem ziarenka Nissla rozrzucone w ten sam sposób, jak i aparat Golgiego, przy czym ziarenka Nissla były wyraźniejsze w tych komórkach, w których aparat był wybitnie czynny.

Podobieństwo lokalizacyjne pomiędzy systemem Golgiego a ziarenkami i wodniczkami wydzielniczymi dało się zauważyć i na naszych preparatach. Umiejscowienie i wielkość aparatu Golgiego odpowiadały zwykle umiejscowieniu i wielkości strefy czynnościowej wyznaczonej obecnością ziarenek i wodniczek neurosekrecyjnych. Była więc w ten sposób wykazana morfologiczna współzależność pomiędzy ziarenkami a aparatem, i o podobnej współzależności wspominają Covell i Scott po zabarwieniu przyżyciowym czerwienią obojętną wodniczek i ziarenek, oraz wyczernieniu siateczki aparatu Golgiego czterotlenkiem osmu. Także już w poprzedniej pracy omawiając umiejscowienie, strukturę i budowę ziarenek i wodniczek zwróciliśmy uwagę, że w komórkach nerwowych zwojów mózgowych u Limnaea, Planorbis i Paludina spostrzega się topograficzne pokrycie elementów neurosekrecyjnych z elementami Golgiego. Wówczas nawet dokładne porównanie wodniczek wydzielniczych z produktem Golgiego pozwoliło sądzić, że pomiędzy jednymi i drugimi nie ma zasadniczych różnic morfologicznych, i że

wodniczki są najprawdopodobniej końcową fazą czynności systemu Golgiego.

Ilość ziarenek Golgiego i ciałek sferoidalnych Thomasa obserwowana w naszym doświadczeniu wzrastała proporcjonalnie do ilości ziarenek i wodniczek neurosekrecyjnych. Ilość ziarenek i wodniczek natomiast pozostawała początkowo w wprost proporcjonalnym stosunku do wzrostu temperatury, a od +45°C w odwrotnie proporcjonalnym. Równocześnie ze wzrostem temperatury spostrzegaliśmy przesunięcie cytoplazmatycznej strefy czynnościowej z bieguna aksonowego i okolicy dokołajądrowej ku obwodowi komórki, tu bowiem gromadziły się po największej części elementy neurosekrecyjne i elementy Golgiego. I jedne i drugie więc, będąc wyrazem przemian odbywających się w cytoplazmie i jądrze, charakteryzują się morfologicznym i fizjologicznym metabolizmem, przechodzą jedne w drugie, a tym samym stanowią nierozłączalne fazy syntez i produkcji.

Drugim ważnym zagadnieniem było stwierdzenie, czy istnieje fizjologiczne połączenie pomiędzy jądrem a ziarenkami, względnie czy można mówić o bezpośrednim udziale jądra w produkcji ziarenek neurowydzielniczych. Ciekawe badania Lewynsona, Platonowej, Utyny i Polenowa skłaniają się raczej do twierdzenia, że są one pochodzenia jądrowego, a nawet obserwowali oni przechodzenie sekretu z jądra do cytoplazmy. Podobny proces był opisany przez Maziarskiego i Kurkiewicza, którzy zbadali, że jądro odgrywa decydującą rolę w procesie wydzielniczym uczestnicząc bezpośrednio w przeróbce materiału dostarczonego przez jąderko.

Na naszych preparatach można było obserwować przyjądrowe względnie jednobiegunowe skupianie się ziarenek i wodniczek, a to pozwalało myśleć o możliwości istnienia fizjologicznych połączeń pomiędzy jądrem a ziarenkami, tym bardziej, że w miejscach tych znajdowała się również strefa czynnościowa Golgiego. Ilość materiału neurosekrecyjnego wzrastała proporcjonalnie do wzrostu temperatury otoczenia, przy czym można było zauważyć stopniowe rozładowywanie się jądra z kwasu dezoksyrybonukleinowego. Rozładowanie jądra wyrażało się zmniejszeniem ilości chromocentrów, które oprócz tego, że miały wygląd grubych ziarenek i umiejscawiały się tuż przy błonie jądrowej, okazywały słaby odczyn barwny Schiffa—Feulgena i znikały prawie całkowicie albo całkowicie w strefie przyjąderkowej. W cytoplazmie natomiast okres rozładowania jądra prowadził do zmniejszenia

ilości ziarenek neurowydzielniczych, ziarenek Golgiego i ciałek sferoidalnych, przy równoczesnym pojawieniu się na obwodzie komórki dużych ilości i dużych rozmiarów słabo barwiących się wodniczek. Współpraca jądra w procesie produkcji ziarenek i wodniczek neurosekrecyjnych nie znajduje potwierdzenia w cytochemicznych odczynach barwnych. Odczyn Feulgena dodatni dla kwasu DRN w jądrze, dla ziarenek i wodniczek wydzielniczych w komórkach zwojowych jest zawsze ujemny.

Wnioski

Badania cytologiczne przeprowadzone były nad dużymi neuronami motorycznymi zwojów mózgowych u ślimaków *Limnaea stagnalis* L. Polegały one na stopniowym podwyższaniu temperatury wody od +18°C do +25, 30, 35, 40 i 45°C, przetrzymywaniu w niej ślimaków przez 20—30 minut i następnie na pobieraniu i utrwalaniu materiału w różnych płynach histologicznych. Skrawki mikrotomowe barwiono hematoksyliną żelazistą, hematoksyliną eozyną, błękitem toluidyny, według trójbarwnej metody Massona, według Wallarta i Houette, według Mallory'ego oraz odczynnikiem Schiffa według metody Feulgena celem wykazania kwasu DRN.

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji dochodzi się do następujących wniosków:

1) Przyjądrowe i jednobiegunowe umiejscawianie się barwikochłonnych ziarenek i wodniczek neurosekrecyjnych wskazuje na możliwość istnienia fizjologicznych połączeń pomiędzy jądrem a ziarenkami, oraz na bezpośredni udział jądra w produkcji ziarenek przedwydzieliny.

2) Umiejscowienie i struktura ziarenek i wodniczek neurowydzielniczych pozwala myśleć o istnieniu morfologicznego i fizjologicznego związku pomiędzy nimi a elementami układu Golgiego. Wodniczki neurosekrecyjne są najprawdopodobniej końcową fazą czynności systemu Golgiego—Thomasa. Ciałka sferoidalne Thomasa, ziarenka neurosekrecyjne Gutnera, Nosowej, Lewynsona i Co, Scharrera i Co i vacuome Parata można uznać za elementy układu Golgiego, które tworzą jeśli nie tę samą fazę, to przynajmniej stoją bardzo blisko siebie, przypuszczalnie na pograniczu kompleksu i właściwego produktu.

3) Elementy Golgiego oraz ziarenka i wodniczki neurowydzielnicze będąc wyrazem przemian odbywających się w cytoplazmie i jądrze mogą przechodzić jedne w drugie, przy czym jedne i drugie stanowią nierozłączalne fazy rytmu pracy komórki.

4) Stopień rozproszenia układu Golgiego i materiału neurosekrecyjnego po cytoplazmie komórek jest dowodem zwiększenia się strefy czynnościowej i świadczy o wzmożonym dynamizmie przemian neuroplazmatycznych.

5) Gromadzenie się większej ilości ciałek sferoidalnych Thomasa w stożku aksonowym komórki obok licznych ziarenek i wodniczek neurowydzieliny, a także umiejscowienie wodniczek również i na obwodzie komórki wskazuje na wzmożenie procesu wydzielniczego. Obserwacji tych dokonano po podwyższeniu temperatury wody do +30, 35 i 40°C.

6) Zmniejszenie ilości ziarenek neurowydzieliny, ziarenek Golgiego i ciałek sferoidalnych Thomasa, przy równoczesnym pojawieniu się na obwodzie komórki dużej ilości słabo barwiących się wodniczek, może świadczyć o osłabieniu lub o zahamowaniu rytmu pracy nie tylko układu Golgiego, ale przede wszystkim jądra i cytoplazmy. W jądrze nawet obserwuje się zmniejszenie ilości chromocentrów kwasu dezoksyrybonukleinowego, które okazywały słaby odczyn barwny Feulgena i nie wybarwiały się prawie całkowicie lub całkowicie w strefie przyjąderkowej. Obserwacji tych dokonano po podwyższeniu temperatury wody do +45°C.

7) Ziarenka neurosekrecyjne są prawdopodobnie materiałem, z którego pod wpływem nieznanych jeszcze przemian powstają golgiosoma, kompleksy sferoidalne i w końcu dojrzała wydzielina (produkt). Umiejscowienie zaś ziarenek neurosekrecyjnych w bezpośredniej bliskości jądra komórki może wskazywać albo na pochodzenie albo na łączność z jądrem, na co jednak w tej chwili dowodów cytochemicznych brak.

PIŚMIENNICTWO

1. Baker J. R. Quart. Journ. Microsc. Scien. Vol. 85, str. 1—72, 1944.
2. Baker J. R. — Quart. Journ. Microsc. Scien. Vol. 87, str. 409—470, 1946.
3. Bourne G. — Cytology and Cell, Physiology. Oxford Univ. Press. Chapt. IV, str. 99—138, 1942.
4. Brachet J. — Embryologie chimique. Ed. Masson. Paris, 1947.
5. Brachet J. — Cpt. rend. Seanc. Soc. Biol. Paris. Vol. 142, str. 1241—1254, 1948.
6. Brachet J. & Shaver J. R. — Stain Technol. Vol. 23, str. 177—184, 1948.
7. Brambell F. W. Rogers & Gatenby J. Bronte — Sci P. R. Dublin. Soc. Vol. 17, str. 275—280, 1924.
8. Brambel F. W. R. — Journ. of Physiol. Vol. 57, str. 415, 1923.
9. Cain A. J. — Quart. Journ. Micr. Scien. Vol. 89, str. 421—428. 1948.
10. Caspersson T. — Zeitsch. f wissenschft. Mikrosk. u. f. mikr. Techn. Vol. 53, str. 403—419, 1936.
11. Caspersson T. — Skand. Arch. f. Physiol. Vol. 73. Suppl. 8. str. 1—151, 1936.
12. Caspersson T., Landström—Hyden H. & Aquilonius L.— Chromosoma Vol. 2, str. 8—23, 1941.
13. Caspersson T. & Schultz J. — Proc. Nat. Acad. Scien. Vol. 26, str. 507—509, 1940.
14. Covell W. P. — Anat. Record Vol. 35, str. 149—163, 1927.
15. Covell W. P. & Scott G. H. — Anat. Record. Vol. 38. str. 377—399, 1928.
16. Dawson A. B. — Federat Proc. Baltimore. Vol. 1, str. 233—240, 1942.
17. Dustin P. — Symp. Soc. Exper. Biol. Cambridge. At the Univers. Press. No 1, str. 114—126, 1947.
18. Estermann B. & Gitlitz A. J. — Anat. Record. Vol. 36, str. 319—324, 1927.
19. Gaupp R. — Zeitsch. f. ges. Neurol. Psychiatr. Vol. 160. str. 357—360, 1938.
20. Gaupp R. — Zeitsch. f. ges. Neurol. Psych. Vol. 165, str. 273—278, 1939.
21. Gatenby J. B. — Proc. Roy. Soc. London (B). Vol. 104, str. 302—321, 1929.
22. Gatenby J. B. — Amer. Journ. Anat. Vol. 51, str. 253—267, 1932.
23. Gatenby J. B. & Hill J. C. — Quart. Journ. Microsc. Scien. Vol. 76, str. 331—352, 1935.
24. Gatenby J. B., Hill J. C. & Macdougald T. J. — Quart. Journ. Microsc. Scien. Vol. 77, str. 129—156, 1936.
25. Grzycki S. — Pol. Akad. Umiej. Kraków. Bullet. Internat. Ser. B. 1951.
26. Grzycki S. — Pol. Akad. Umiej. Kraków. Bullet. Inter. Ser. B. 1951.

27. Gutner J. J. & Nosowa G. D. – Dokł. Akad. Nauk. SSSR. Vol. 77. str. 105—107, 1951.

28. Herzog F. — Beitr. pathol. Anat. Vol. 101, str. 390—409, 1938.

29. Hirsch G. C. — Protopl. Monograph. Vol. 18. Borntraeger. Berlin. 1939.

30. Ito T. & Nagahiro K. — Okajima's Folia anat. jap. Vol. 15, str. 609—634, 1937.

31. Kedrowsky B. W. — Usp. Sowr. Biol. Vol. 23, str. 375—404, 1947.

32. Kurkiewicz T. — Bull. Assoc. Anat. Varsovie, str. 252—255, 1931.

33. Lennette E. H. & Scharrer E. — Anat. Record. Vol. 94. str. 85—92, 1946.

34. Lewynson L. B. & Platonowa G. N. — Dokł. Akad. Nauk. SSSR. Vol. 58, str. 1769—1772, 1947.

35. Lewynson L. B. & Platonowa G. N. — Dokł. Akad. Nauk. SSSR. Vol. 60. str. 129—132, 1948.

36. Lewynson L. B. & Utyna I. A. — Dokł. Akad. Nauk. SSSR. Vol. 66, str. 269—272, 1949.

37. Maziarski St. — Arch. f. Zellforsch. Vol. 6, str 397—442, 1911.

38. Moussa T. A. A. — Journ. Morph. Vol. 87 str. 28—60, 1950.

39. Moussa T. A., Gatenby J. B & Tohamy A. — Nature Vol. 162, str. 736, 1948.

40. Palay S. L. — Neurosecretion V. Journ. Comp. Neurol. Vol. 79, str. 247—275, 1943.

41. Parat M. — Cpt. rend. Assoc. Anat. Nancy No 3, str. 383—388, 1928.

42. Parat M. & Painleve J. — Cpt. rend. acad. scien. Vol. 180, str. 1134—1138, 1925.

43. Parat M, & Painleve J. — Cpt. rend. Soc. Biol. Vol. 92, str. 65—66. 1925.

44. Pawlikowski T. — Cpt. rend. Soc. Biol. Vol. 120, str. 469, 1935.

45. Pawlikowski T. — Fol. Morphol. Vol. 2, str. 218—238, 1937.

46. Pawlikowski T. — Pozn. Tow. Przyj. Nauk. Vol. 5. str. 189—316, 1938.

47. Polenow A. L. — Dokł. Akad. Nauk. SSSR. Vol. 73, str. 1025—1028, 1950

48. Pollister A. W. & Leuchtenberger C. — Proc. Nat. Acad. Scien. Washington. Vol. 35, str. 111—116, 1949.

49. Pollister A. W. & Leuchtenberger C. — Proc. Nat. Acad. Scien. Easton. Vol. 35, str. 66—71, 1949.

50. Pollister A. W. — Quart. Journ. Microsc. Scien. Vol. 81, str. 235—272, 1940.

51. Rau A. Subba & Ludford R. J. — Quart. Journ. Microsc. Scien. Vol. 69, str. 509—517, 1928.

52. Roussy G. & Mosinger M. — Cpt. rend. Biol. Paris. Vol. 126, str. 1066—1067, 1937.

53. Scharrer E. & Scharrer B. — Physiol. Rev. Vol. 25, str. 171—181, 1945.

54. Scharrer E., Palay S. L. & Nilges R. G. — Anat. Record. Vol. 92. str. 23—31, 1945.

55. Thomas O. L. — Quart. Journ. Microsc. Scien Vol. 88, str. 445—462, 1947.

56. Thomas O. L. — Quart. Journ. Microsc. Scien. Vol. 88, str. 269—273, 1947.

57. Thomas O. L. — Quart. Journ. Microsc. Scien. Vol. 89. str. 333—350, 1948.
58. Young J. Z. — Quart. Journ. Microsc. Scien. Vol. 75, str. 1—48, 1934.
59. Wallart J. & Houette Ch. — Anat. Anz. Vol. 69, str. 43—46, 1930.
60. Wallart J. & Houette Ch. — Bull. d. Histol. Appl. Vol. 10, str. 404—407, 1934.
61. Worley L. G. — Journ. Morphol. Vol. 75, str. 261—280, 1944.
62. Worley L. G. — Annal. New York Acad. Scien. Vol. 47, str. 1—56, 1946.

OBJAŚNIENIA DO MIKROFOTOGRAFII

Mikrofot. Nr 1. *Limnaea stagnalis* L. W cytoplazmie komórek nerwowych zwoju mózgowego widoczne różnej wielkości ziarenka i wodniczki neurowydzielnicze. Szczególnie duże wodniczki (W) znajdują się w strefie obwodowej komórki i w stożku aksonowym (SA). Temperatura wody +40°C. Utrwalanie w płynie Regaud. Barwienie hematoksyliną żelazistą według Heidenhaina. Filtr zielony. Powiększenie duże.

Mikrofot. Nr 2. *Limnaea stagnalis* L. Duża ilość słabo barwiących się wodniczek neurowydzieliny w strefie obwodowej komórki (W) i w stożku aksonowym (SA). Kilka ziarenek znajduje się tuż przy biegunie aksonowym jądra (Z). Temperatura wody +45°C. Utrwalanie w alkoholu-formalinie. Barwienie według Mallory'ego. Filtr żółty. Powiększenie duże.

РЕЗЮМЕ

Цитологические исследования были проведены над большими моторными нейронами мозговых ганглиев улитки *Limnaea stagnalis*. Состояли они на систематическом повышении температуры воды от + 18° С до + 25°, 30, 35, 40 и 45° С, оставляя улитки в ней на 20—30 минут, а потом полученный материал был фиксирован в разных гистологических растворах. Микротомные препараты окрашивались железистым гематоксилином, гематоксилин эозином, тулоидиновой лазурью по трехцветному способу Massona, по Wallarta и Houette, по Mallory а также реактивном Schiffa по способу Feulgena, чтобы выкрыть D. P. H. кислоту. На основании проведенных наблюдений автор приходит к следующим выводам:

1. Приядерное и однополюсное расположение краскохлонных зерен и нейросекреционных вакуолей указывалобы на возможность существования физиологических связей между зернышками и ядром, а также непосредственное участие ядра в продукции зерен предвыделений.

2. Локализация и структура зерен и нейровыделительных вакуолей позволяет предполагать о существовании морфологической и физиологической связи между ними и элементами Гольджиевой системы. Нейросекреционные вакуоли, следует думать, являются окончательной фазой функции системы Гольджи-Томаса. Сфероидальные тельца Thomasa, нейросекреционные зерна Gutnera, Nosowoj, Lewynsona & Co Scharvera & Co и „vacuome" Parata, можно зачислить к системе Гольджиего аппарата, которые образуют если не эту самую фазу, то во всяком случае расположены близко себя, более или менее на пограничьи комплекса и основного продукта.

3. Гольджиевы элементы, а также зернышки и нейровыделительные вакуоли, будучи выразителями происходящих изменений в цитоплазме и ядре, могут переходить из одних в другие, а этим самым составляют неразделимые фазы ритма работы клетки.

4. Степень раздробления Гольджиего аппарата и нейросекреционного материала по цитоплазме клеток, является фактом увеличения зоны функциональной и свидетельствует о насиленной динамике нейроплазматических изменений.

5. Накапливание большого числа сфероидальных телец Томаса в аксоновом конусе клетки, среди многочисленных зерен и вакуолей нейровыделений, а также расположение вакуолей и на периферий клетки, указывает на насиление выделительного процесса. Наблюдения эти проведены при повышении температуры воды до + 30, 35 и 40°C.

6. Уменьшенное число зерен нейровыделений, зерен Гольджего и сфероидальных телец Томаса при одновременном появлении на периферии клетки слабо окрашивающейся вакуоли, может свидетельствовать о ослабении или заторможении ритма работы не только системы Гольджего, но прежде всего ядра и цитоплазмы. В ядре можно наблюдать уменьшенное количество хромоцентров дизоксирыбонуклеиновой кислоты, которые проявляли слабую реакцию окраски Feulgena и не выкрашивались почти совершенно только в зоне приядрышковой. Наблюдения эти проведены после повышения температуры воды до 45°C.

7. Нейросекреционные зерна являются, как следует предполагать, материалом, с которого под влиянием неизвестных еще изменений образуются гангносомы, сфероидальные комплексы и в конце сформированный продукт. Нейросекреционные зерна расположены непосредственно около ядра клетки, что может указывать на происхождение или связь с ядром, но в настоящее время не имеем еше доказательств.

ОБЪЯСНЕНИЯ К МИКРОФОТОГРАФИЯМ

Микрофот. 1. *Limnaea stagnalis* L. В цитоплазме нервных клеток мозгового сплетения, видны зерна различной величины и нейровыделительные вакуоли. Особенно большие вакуоли (W) находится в периферической зоне клетки и в аксоновом конусе. (SA). Температура воды 40°C. Фиксирование в растворе Regaud. Окраска железистым гематоксилином по способу Heidenheina. Зеленый фильтр. Большое увеличение.

Микрофот. 2. *Limnaea stagnalis* L. Большое число слабоокращивающихся нейровыделительных вакуолей, в периферической зоне клетки (W) и в аксоновом конусе (SA). Несколько зерен находится поблизости аксоного полюса ядра (Z). Температура воды + 45°C. Фиксирование в спирте-формалине. Окраска по способу Mallory'го. Желтый фильтр. Большое увеличение.

SUMMARY

The cytological investigations were conducted on large motor neurons of cerebral ganglions of snails *Limnaea stagnalis* L. The temperature of the water was gradually raised from +18°C to +25, 30, 35, 40 and 45°C, the snails were kept in it for 20—30 minutes and subsequently the material was taken and fixed in various histological fluids. Microtom sections were stained with iron haematoxylin, haematoxylin-eosin, toluidin blue, according to Masson's trichrom stain method, acording to Wallart & Houette's, according to Mallory and with Schiff's reagent according to Feulgen's method to demonstrate the presence of DRNA.

On the basis of observations the following conclusions were reached:

1) The paranuclear and monopolar localization of the chromophilic granules and neurosecretory vacuoles indicate the possibility of the existence of physiological connections between the nucleus and granules and a direct participation of the nucleus in the production of prosecretion granules.

2) The localization and structure of the neurosecretory granules and vacuoles lead to the supposition that there must be a morphological and physiological relationship between them and the elements of the Golgi system. The neurosecretory vacuoles are most likely the final phase of the Golgi—Thomas' system activities. Thomas' spheroidal corpuscles, Gutner's, Lewynson's & Co, Scharrer's & Co neurosecretory granules, and Parat's vacuome may be regarded as elements of the Golgi system, which form, if not the same phase, then at least closely related structures, placed, most likely, on the bordes of the complex and the proper product.

3) The Golgi elements, granules and neurosecretory vacuoles, being an expression of metabolism taking place in the cytoplasm and nucleus, may pass one into another and therefore they form inseparable phases of the rhythm of the cell's work.

4) The degree of the dispersal of the Golgi system and the neurosecretory material in the cytoplasm of cells is an evidence of an increase of the dynamic sphere and a proof that the dynamism of neuroplasmatic metabolism is increased.

5) The accumulation of a larger number of Thomas' spheroidal corpuscles in the cell's axonal hillock beside the numerous granules and neurosecretory vacuoles and localization of the vacuoles likewise on the periphery of the cell are an indication of an increase of the secretory process. These observations were made after the raising of the temperature to +30, 35 and 40°C.

6) The decrease of the number of granules of the neurosecretion, Golgi's granules and Thomas' spheroidal corpuscles at the simultaneous appearance on the periphery of the cell of a large number of slightly stained vacuoles may indicate a decrease, or hindrance of rhythm of work not only of the Golgi system, but first of all of the nucleus and the cytoplasm. In the nucleus there may be even observed a decrease of the number of chromocentres of the desoxyribonucleic acid, which exhibited a mild Feulgen's stain reaction and were not nearly completely, or completely stained in the paranuclear zone. These observations were made after the raising of the temperature to +45°C.

7) The neurosecretory granules are most probably a material, from which under the influence of not yet fully known processes the golgiosoma, spheroidal complexes and finally the mature secretion (product) are formed. The localization of the neurosecretory granules in the direct proximity of the cell's nucleus may be an indication either of the origin, or a connection with the nucleus, but cytochemical proofs are still lacking.

EXPLANATION OF THE MICROPHOTOGRAPHS

Microphot. No 1. *Limnaea stagnalis* L. In the cytoplasm of nerve cells of the cerebral ganglion there can be seen of various size granules and neurosecretory vacuoles. Particularly large vacuoles (W) are found in the peripheral zone of the cell and in the axonal hillock (SA). The temperature of water +40°C. Fixed in Regaud's fluid. Stained with iron haematoxyline according to Heidenhain. Green filter. High power.

Microphot. No 2. *Limnaea stagnalis* L. A large number of slightly stained neurosecretory vacuoles in the peripheral zone of the cell (W) and in the axonal hillock (SA). Several granules are close to the axonal pole of the cell (Z). The temperature of water +45°C. Fixed in alcohol-formaldehyde. Stained according to Mallory. Yellow filter. High power.

Papier druk sat. III kl. 70 g. Format 70 x 100. Ark. druku 1 i 3/4.
Annales U. M. C. S. Lublin 1952. Lubelska Drukarnia Prasowa, ul. Kościuszki 4, Zam. Nr 178 19.I.52
1200 egz. A-3-10572 Data otrzymania manuskryptu 19.I.52. Data ukończenia druku 2.IV.1952.